

Untersuchungen über den Mechanismus der
Schiff'schen Aldehydreaktion
und über die Einwirkung von Perjodsäure
auf Prokollagen

In a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Ludwig Maximilians Universität
zu München



vorgelegt im Januar 1958

von G e r h a r d F r i e s
aus Regensburg

Die vorliegende Arbeit ist das Ergebnis
einer sorgfältigen Bearbeitung der
auf dem Gebiet der Chemie
erhaltenen Literatur.

Die vorliegende Arbeit ist das Ergebnis
einer sorgfältigen Bearbeitung der
auf dem Gebiet der Chemie
erhaltenen Literatur.

Vorgelegt im Januar 1958

von Dr. R. Huisgen
aus Regensburg

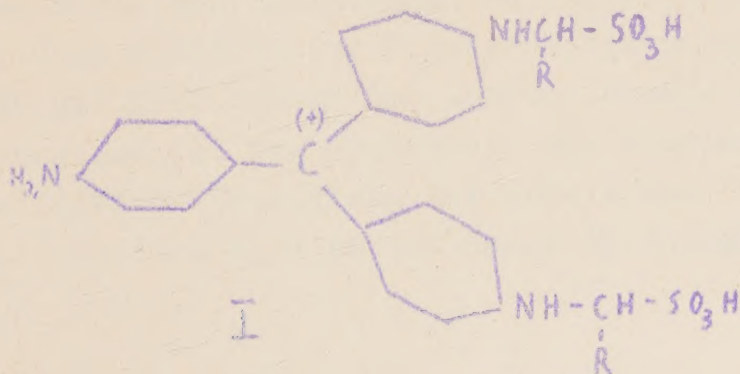
1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Graßmann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Huisgen
Tag der mündlichen Prüfung: 25.6.58

Aufgabenstellung.

In der hier in Kurzfassung vorliegenden Dissertation war die Aufgabe gestellt, die insbesondere durch die vorausgehende Arbeit von Grassmann und Kühn¹⁾ interessant gewordene Perjodatoxydation von kollagenem Material, hier Prokollagen, zu bearbeiten. Im Laufe der Untersuchung stellte sich heraus, daß zu einem Verständnis der bei der Perjodat-Schiff-Reaktion (PAS-R.) dieses Materials beobachteten Erscheinungen eine genauere Untersuchung des Reaktionsverlaufs der Schiffischen Fuchsin-schwefligsäurereaktion auf Aldehyde notwendig war. Dadurch erlitt die Dissertation eine Aufspaltung in zwei Hauptteile, deren erster sich hauptsächlich mit dem Reaktionsmechanismus der Schiffischen Reaktion befasst und deren zweiter die chemischen Veränderungen essigsaurer Prokollagenlösungen bei der Oxydation mit Perjodatlösung behandelt.

Ergebnisse des ersten Hauptteils.

In Übereinstimmung mit den Arbeiten früherer Autoren^{2,3)} wurde gefunden, daß der erste Schritt der Farbreaktion in einer Reaktion von Aminogruppen der farblosen Fuchsin-leukosulfonsäure mit Aldehyd und schwefliger Säure besteht, und von der Abdissoziation der am Zentral-C gebundenen Leukosulfonsäuregruppe unter Bindung eines gefärbten substituierten Triphenylmethylikations (I) gefolgt wird.



Der ursächliche Zusammenhang zwischen der Bildung von α -Aminoalkylsulfonsäuregruppierungen an mindestens 2 Aminogruppen der Fuchsinleukosulfonsäure und deren Dissoziation zum Farbkation konnte auf elektronentheoretischer Grundlage interpretiert werden: Durch die benachbarten Sulfonsäuregruppen wird die Basizität der Arylaminogruppen soweit abgeschwächt, daß sie in dem mäßig sauren Reaktionsmedium nicht mehr in der Lage sind, eine Salzbildung einzugehen. Andererseits wird das freie Elektronenpaar des Stickstoffs aber nicht vollkommen von der Sulfonsäure beansprucht, sodaß es teilweise für die Kernsomerie des aromatischen Systems zur Verfügung steht. Die bei der Abdissoziation der Leukosulfonsäure gewinnbare, durch die Substitution an den Aminogruppen vergrößerte Mesomerieenergie des gesamten Triphenylmethansystems löst die Dissoziation zum Farbstoff aus. Der Mechanismus der Reaktion an den einzelnen Aminogruppen wurde im Sinne einer Mannich-Reaktion gedeutet. Das experimentelle Bild wird dadurch ziemlich verwickelt, daß derselbe Reaktionspartner, nämlich SO_2 , die Substitution beschleunigt, während dessen die folgende, zum Farbstoff führende Dissoziation, deren Dissoziationskonstante bestimmt werden konnte, hemmt. Durch die weitere Tatsache, daß zum Zustandekommen einer Farbreaktion die Substitution an mindestens zwei Aminogruppen nötig ist und darüber hinaus eine Substitution an drei Aminogruppen bei der Leukosulfonsäure zwar statistisch wenig wahrscheinlich, beim dissoziierten Farbkation aber energetisch begünstigt ist, ergeben sich eine Reihe von Besonderheiten der Reaktion, welche sie für eine quantitative Aldehydbestimmungsmethode nicht sehr geeignet erscheinen lassen: Starke Abhängigkeit der Farbintensität vom SO_2 -Gehalt des Reagens mit einem Empfindlichkeitsmaximum bei etwa einem Verhältnis SO_2 : Aldehyd = 1; nichtlineare Abhängigkeit der Farb

intensität von der Aldehydkonzentration; ein definierter Endwert der Farbintensität wird bei Monoaldehyden nicht erreicht: Bei Formaldehyd wegen langsamer sekundärer Bildung des trisubstituierten Farbkations, bei höheren Fettaldehyden wegen der Zersetzlichkeit des gebildeten Farbstoffs infolge geringerer Carbonylaktivität dieser Aldehyde. Lineare Abhängigkeit von der Aldehydkonzentration und definierter Endwert der Färbung zeigen jedoch hochmolekulare Polyaldehyde, wie z.B. das Perjodatabbauprodukt von Stärke, da in diesem Fall aus sterischen Gründen in der primären Reaktion bereits das trisubstituierte Triphenylmethansystem gebildet wird.

Ergebnisse des zweiten Hauptteils.

Die im Verlauf der Perjodatoxydation essigsaurer Prokollagenlösungen auftretenden chemischen Veränderungen wurden in Abhängigkeit von der Oxydationszeit (bis zu 200 Std.) bestimmt, und zwar im einzelnen: Die Entwicklung von Formaldehyd und Ammoniak, die Abnahme des Hexosengehalts, die Veränderungen im Gehalt an freien Aminogruppen, der Verlauf der PAS-Reaktion und das Dialyseverhalten. Ferner wurden Aminosäureanalysen des Ausgangsmaterials, einer 5 St. und einer 150 Std. lang oxydierten Probe ausgeführt. Die Auswertung all dieser Ergebnisse lieferte folgendes Bild: Die vorhandenen Hexosen werden rasch zerstört, bis auf einen etwa 20 % des Ausgangsgehalts betragenden Rest, welcher auch bei fortgesetzter Oxydation erhalten blieb. Dies weist auf die Anwesenheit eines Saccharids mit 1-3 Verknüpfung hin. Hydroxylysin wird erwartungsgemäß verhältnismäßig rasch und nach längerer Oxydation vollständig abgebaut. In den Aminosäureanalysen wurde in etwa äquivalenter Menge eine nicht identifizierte Aminosäure gefunden, welche vermutlich das Abbauprodukt aus Hydroxylysin

darstellt. Ein teilweiser Angriff wurde daneben auf die Aminosäuren Tyrosin, Methionin, Hydroxyprolin und Arginin festgestellt; soweit ausgeführt in Übereinstimmung mit entsprechenden Versuchen an Modellpeptiden. Die PAS-Reaktion des Materials durchläuft ein ziemlich scharfes Maximum nach etwa 2,5 Std. Oxydationszeit und fällt dann auf etwa $\frac{1}{3}$ des maximalen Wertes ab. Eine eindeutige Erklärung für dieses Verhalten konnte nicht gefunden werden, doch wurde eine Weiteroxydation von gebildeten Aldehyden ebenso wie eine Maskierung durch freie Aminogruppen als Ursache ausgeschlossen. Als evtl. Erklärungsmöglichkeit wurde eine sterische Umgruppierung der Aldehydgruppenanordnung in Betracht gezogen, welche nach den Ergebnissen des 1. Hauptteils bezüglich hochmolekularer Polyaldehyde einen Abfall der Schiffischen Reaktion ohne Zerstörung der einzelnen Aldehydgruppen verursachen könnte.

Die vermutete Anwesenheit von Perjodat-spaltbaren Brückengliedern in der Peptidkette des Prokollagens¹⁾ konnte durch die angestellten Versuche nicht bestätigt werden. Ein deutlicher Unterschied zwischen Phenyljodosoacetat- und Perjodatoxydation wurde durch vergleichende Dialyseversuche und Amino-N-Bestimmungen festgestellt.

Literatur:

- 1 W.Graßmann u.K.Kühn, Z.physiol.Ch. 301, 1 (1955)
- 2 H.Wieland u. G.Scheuing, Ber.d.chem.Ges. 54, 2527 (1921)
- 3 P.Rumpf, Ann.Chim. 3 (11), 327 (1935)

